



华支睾吸虫囊蚴 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立

苑淑贤¹, 侯绪森¹, 宫鹏涛², 郭衍冰¹, 董航¹, 孙兴忠¹, 王楠¹, 曹利利^{1*}

(1. 吉林省畜牧兽医科学研究所, 长春 130062; 2. 吉林大学 动物医学学院, 长春 130062)

中图分类号: S855.9

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2023)17-0007-08

摘要: 为了建立一种特异且敏感的华支睾吸虫囊蚴 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法, 试验针对华支睾吸虫线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 1 (CSCO I) 基因设计特异性引物, 筛选最佳引物浓度和退火温度, 绘制标准曲线, 优化扩增体系和程序建立 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法, 并评价该方法的敏感性、特异性、重复性及符合性。结果表明: 最佳引物浓度为 750 nmol/L, 最佳退火温度为 57 ℃。标准曲线的斜率为 -3.21, 截距为 35.23, 相关系数 (R^2) 为 0.982 3。该方法的最低检出限为 1×10^2 copies/ μ L; 批间和批内变异系数分别为 1.53% ~ 2.59% 和 0.36% ~ 0.76%, 表现出良好的重复性; 仅标准阳性质粒、华支睾吸虫囊蚴及肝片吸虫出现特异性扩增曲线, 具有较好的特异性; 与传统压片镜检法比较符合率为 96%。说明试验建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法敏感、特异、稳定, 为后续开展淡水鱼感染华支睾吸虫囊蚴的流行病学调查提供了技术支持。

关键词: 华支睾吸虫; 囊蚴; CSCO I; SYBR Green I; 实时荧光定量 PCR

开放科学(资源服务)标识码
Open Science Identity (OSID)



华支睾吸虫病 (clonorchiasis) 是由华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*) 寄生于人或动物肝胆管系统引起的一种人兽共患食源性寄生虫病^[1-2]。人或动物在食入含有华支睾吸虫活囊蚴的淡水鱼或虾类后, 囊蚴在消化液的作用下进入十二指肠进行脱囊, 随后移行至肝胆管发育寄生, 导致宿主患病^[3]。目前, 全球已有超过 3 000 万人感染华支睾吸虫, 中国、越南、韩国等国家均有报道, 我国多发生于东北、华南和华中地区^[4-8]。目前, 华支睾吸虫囊蚴的检测方法还没有统一标准, 主要依赖于显微镜镜检, 但此种检测方法繁琐且费时, 检出率低, 对于与华支睾吸虫亲缘关系相近的形态相似的囊蚴虫卵不易区分, 且不利于大批量样品的检测。

SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法具有特异性强、敏感性高、重复性好等优点, 对多种寄生虫、病

毒、细菌等具有较好的诊断效果, 然而用该方法检测淡水鱼华支睾吸虫囊蚴的研究报道较少。本试验针对华支睾吸虫线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 1 (CSCO I) 基因序列设计特异性引物, 筛选最佳引物浓度和退火温度, 绘制标准曲线, 优化扩增体系和程序建立 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法, 并评价该方法的敏感性、特异性、重复性及符合性, 以期为临床快速检测华支睾吸虫囊蚴提供技术支持, 并为后续开展淡水鱼华支睾吸虫囊蚴感染的流行病学调查提供帮助。

1 材料

1.1 样品

华支睾吸虫囊蚴、阔节裂头绦虫、日本血吸虫、棘口吸虫及柔嫩艾美耳球虫基因组 DNA, 由吉林省畜牧兽医科学研究所寄生虫病研究室保存。鱼肉样本 50 份, 采自吉林省大安市月亮泡湖。

1.2 主要试剂与菌株

2×Taq PCR Mastermix、DNA 纯化回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; DL-2 000 Marker、pMD-19T 载体, 均购自宝生物工程(大连)有限公司; NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus, 购自安诺论(北京)生物

收稿日期: 2022-09-29; 修回日期: 2023-05-29

基金项目: 吉林省科技发展计划技术攻关项目(20190303109SF)

作者简介: 苑淑贤(1963—), 女, 研究员, 本科, 研究方向为寄生虫学, 873474548@qq.com。

* 通信作者: 曹利利(1981—), 女, 研究员, 博士, 研究方向为寄生虫学, 410710622@qq.com。



科技有限公司。

2 方法

2.1 标准阳性质粒的构建

根据 GenBank 中 CSCO I 基因序列(登录号为 AF181889. 3) 利用 Primer Premier 5. 0 软件设计并合成引物 CSCO I -F 5'-GTGTTAATATTGCCGGGGTT-3'和 CSCO I -R 5'-AGCAATAACAAACCAAGTATC-3'。以华支睾吸虫囊蚴基因组 DNA 为模板, 使用 CSCO I -F/CSCO I -R 特异性引物, 应用 2×Taq PCR Mastermix 对 CSCO I 基因进行 PCR 扩增, 预扩增片段大小约为 369 bp。PCR 扩增体系: Taq PCR Mastermix(2×) 25 μ L, 模板 1 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 2 μ L, 用 ddH₂O 补足至 50 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 扩增产物经 DNA 纯化回收试剂盒回收后与 pMD-19T 载体相连, 并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中构建标准阳性质粒 pMD19-T-CSCO I, 并将其送至生工生物工程(上海) 股份有限公司进行测序, 测序结果与 GenBank 中 CSCO I 基因序列(登录号为 AF181889. 3) 进行 BLAST 比对分析。

2.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中 CSCO I 基因序列(登录号为 AF181889. 3) 利用 Primer Premier 5. 0 软件设计并合成 SYBR Green 染料法使用引物 CSCO I -1-F 5'-TCTGGGTAGGGTGGTTTGA-3'和 CSCO I -1-R 5'-ATAGACGCTCCCGAGTTCC-3'。

2.3 扩增体系及程序的优化

以制备的标准阳性质粒(1×10^9 copies/ μ L) 为模板, 将 CSCO I -1-F/CSCO I -1-R 引物终浓度设定为 250, 500, 750, 1 000 nmol/L, 退火温度设定为 51, 53, 55, 57, 59 $^{\circ}$ C, 以确定最佳引物使用浓度及退火温度。扩增体系: NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 10 μ L, 标准阳性质粒模板 2 μ L, CSCO I -1-F/CSCO I -1-R 引物各 1 μ L, 用 ddH₂O 补足至 20 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 退火 20 s, 共 40 个循环。

2.4 标准曲线的建立

采用已经优化的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法, 对标准阳性质粒进行 10 倍梯度稀释($1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^3$ copies/ μ L), 以其为模板进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 扩增, 通过分析扩增结果选取最佳浓度建立标准曲线。

2.5 敏感性试验

对标准阳性质粒进行 10 倍梯度稀释($1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^2$ copies/ μ L), 以其为模板进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 扩增, 根据自动生成的动力学曲线确

定最低检出限。当 Ct 值 ≤ 30 时, SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 结果判定为阳性。

2.6 特异性试验

分别以标准阳性质粒和华支睾吸虫囊蚴、肝片吸虫、阔节裂头绦虫、日本血吸虫、棘口吸虫、柔嫩艾美耳球虫基因组 DNA 为待检样品, 同时设 ddH₂O 作为阴性对照, 采用试验建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法进行特异性试验, 以检测该方法的特异性。

2.7 重复性试验

取 3 份不同拷贝数的标准阳性质粒为模板重复 3 次进行批内检测, 再取 3 份不同拷贝数的标准阳性质粒为模板分为 3 批进行批间检测, 以验证试验建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的重复性, 获得批内和批间的变异系数。

2.8 符合性试验

分别采用本试验建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法及传统压片镜检法对 50 份鱼肉样品进行检测, 并计算两种方法的符合率, 符合率 = $(a + d) / (a + b + c + d) \times 100\%$ 。式中: a 为经本试验方法和传统压片镜检法检测均为阳性的样品数; b 为经本试验方法检测为阳性而传统压片镜检法检测为阴性的样品数; c 为经本试验方法检测为阴性而传统压片镜检法检测为阳性的样品数; d 为经本试验方法和传统压片镜检法检测均为阴性的样品数。检测结果的统计方式见表 1。

表 1 检测结果的统计方式

Table 1 Statistical method of test results

项目	传统压片镜检法		合计
	阳性	阴性	
SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法	a	b	$a+b$
传统压片镜检法	c	d	$c+d$
合计	$a+c$	$b+d$	$a+b+c+d$

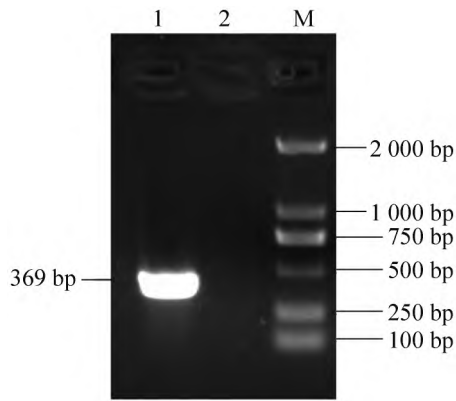
3 结果与分析

3.1 标准阳性质粒的构建

以华支睾吸虫囊蚴基因组 DNA 为模板, 利用 CSCO I -F/CSCO I -R 特异性引物进行 PCR 扩增, 结果(见图 1) 得到大小为 369 bp 的目的片段, 与预期结果相符。将目的片段送至生工生物工程(上海) 股份有限公司进行测序分析, 结果显示插入的目的基因大小为 369 bp; 将该基因序列与 GenBank 中 CSCO I 基因序列(登录号为 AF181889. 3) 进行 BLAST 比对分析, 显示相似性为 100%, 说明标准阳性质粒 pMD19-T-CSCO I 构建成功。

3.2 最佳扩增体系及程序的确定

当上下游引物终浓度为 750 nmol/L 时, 标准阳性质粒能呈现相对高的荧光信号, 见 139 页彩图 2。选择最佳引物浓度 750 nmol/L, 当退火温度为 57 $^{\circ}$ C



1.CSCO I 基因片段; 2.阴性对照; M.DL-2 000 Marker。

图1 CSCO I -F/CSCO I -R 引物的扩增结果

 Fig.1 Amplification results of CSCO I -F/
CSCO I -R primers

时,标准阳性质粒能呈现相对高的荧光信号,见140页彩图3。因此,确定用于检测华支睾吸虫囊蚴的SYBR Green I 实时荧光定量PCR 扩增体系(总体积为20 μL):模板2 μL ,750 mmol/L 上下游引物各1.5 μL ,NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 10 μL ddH₂O 5 μL 。扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火20 s,共40个循环。

3.3 标准曲线的建立

应用已优化的SYBR Green I 实时荧光定量PCR 扩增体系和程序,以10倍梯度稀释的标准阳性质粒($1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^3$ copies/ μL)为模板进行扩增,结果见图4。标准曲线的斜率为-3.21,截距为35.23,方程为 $y = -3.21x + 35.23$,相关系数(R^2)为0.9823,见图5。表明本试验建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR 方法具有较高的扩增效率。

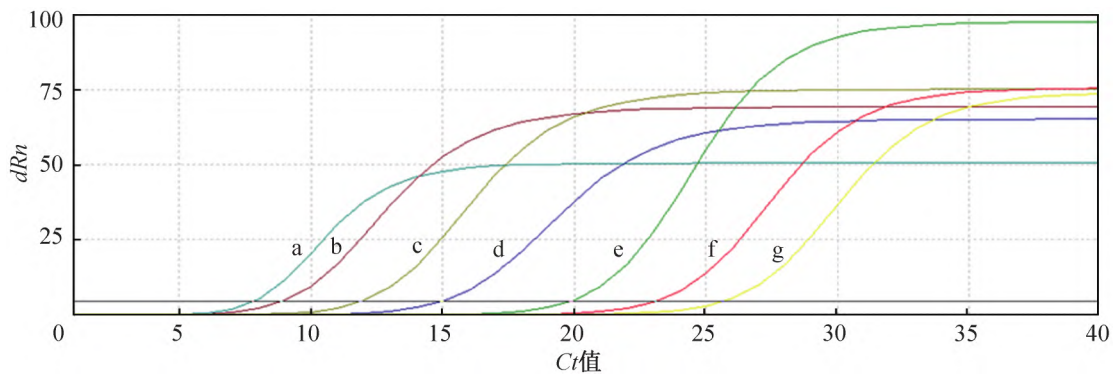

 a~g. 模板浓度为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^3$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

图4 标准阳性质粒的扩增结果

Fig.4 Amplification results of the standard positive plasmid

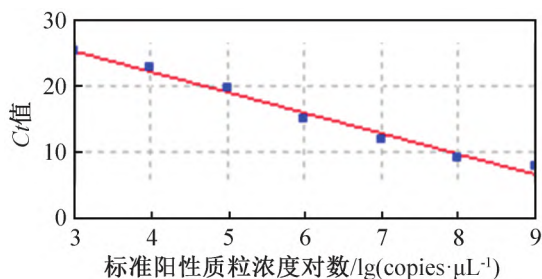


图5 SYBR Green I 实时荧光定量PCR 扩增的标准曲线

 Fig.5 Standard curve of SYBR Green I real-time
fluorescent quantitative PCR

3.4 敏感性试验

结果见图6。

由图6可知,在Ct值 ≤ 30 时,最低检出限为 1×10^2 copies/ μL ,可见试验建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR 方法具有较好的敏感性。

3.5 特异性试验

结果见图7。

由图7可知,除标准阳性质粒、华支睾吸虫囊蚴

及肝片吸虫出现特异性扩增曲线外,其余均未出现,可见试验建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR 方法具有较好的特异性。

3.6 重复性试验

结果见表2和表3。

由表2和表3可知,批内变异系数在0.36%~0.76%之间,批间变异系数在1.53%~2.59%之间,表明建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR 方法具有良好的重复性。

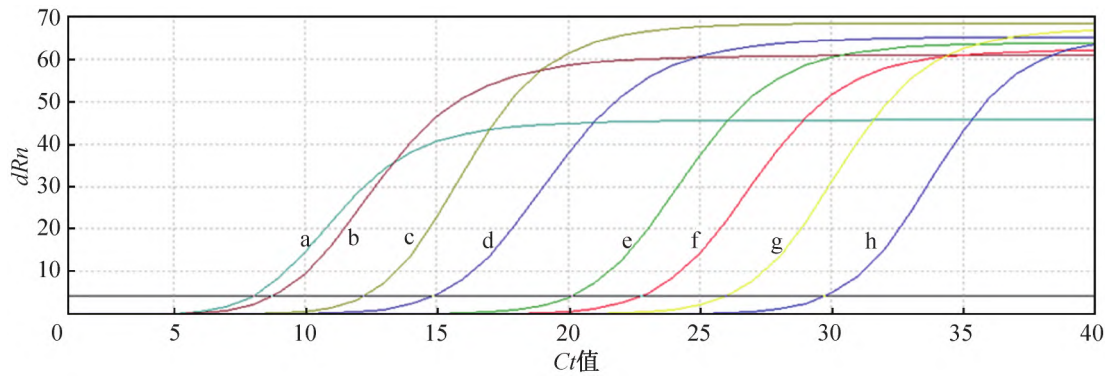
3.7 符合性试验

结果见表4。

由表4数据经计算可知:传统压片镜检法的阳性率为18%(9/50),SYBR Green I 实时荧光定量PCR 方法的阳性率为22%(11/50),符合率为96%,说明SYBR Green I 实时荧光定量PCR 方法比传统压片镜检法具有更好的敏感性。

4 讨论与结论

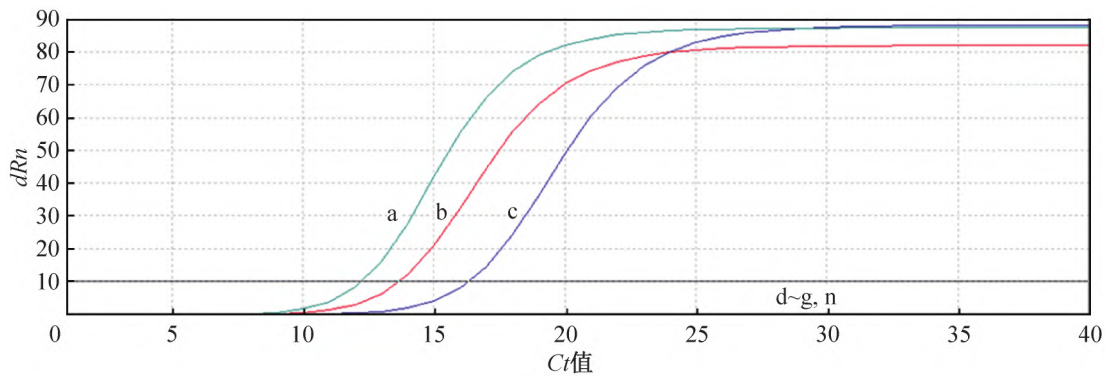
食品安全问题一直是备受关注的全球性重大公共卫生问题。随着经济发展和生活水平的不断提高,



a~h. 模板浓度为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^2$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

图 6 敏感性测定结果

Fig.6 Determination results of sensitivity



a. 华支睾吸虫囊蚴基因组 DNA; b. 标准阳性质粒; c. 肝片吸虫基因组 DNA;
d~g. 分别为阔节裂头绦虫、日本血吸虫、棘口吸虫、柔嫩艾美耳球虫基因组 DNA; n. 阴性对照。

图 7 特异性试验结果

Fig.7 Test results of specificity

表 2 批内重复性测定结果

Table 2 Determination results of intra-batch repeatability

编号	Ct 值			平均 Ct 值	标准偏差	变异系数 /%
	第 1 次检测	第 2 次检测	第 3 次检测			
1	21.70	21.85	21.52	21.69	0.17	0.76
2	15.42	15.32	15.33	15.36	0.06	0.36
3	18.45	18.59	18.35	18.46	0.12	0.65

表 3 批间重复性测定结果

Table 3 Determination results of inter-batch repeatability

编号	Ct 值			平均 Ct 值	标准偏差	变异系数 /%
	第 1 次检测	第 2 次检测	第 3 次检测			
1	12.73	12.61	12.12	12.49	0.32	2.59
2	15.72	15.41	16.12	15.75	0.36	2.26
3	10.16	10.29	9.98	10.14	0.16	1.53

人们对鲜嫩口感和美味的追求逐渐多样化 ,导致由食源性寄生虫引起的食品安全问题日益突出。淡水鱼为华支睾吸虫的中间宿主 ,而许多人喜食生的淡水鱼 ,这种饮食习惯直接导致华支睾吸虫在人群中持续性传播^[9-11]。目前 ,尚无可用于预防华支睾吸虫感染

的有效疫苗^[12]。据报道 ,我国华支睾吸虫的感染者有 3 500 万人 ,东南亚华支睾吸虫的感染者有 1 000 万人 ,东欧和俄罗斯华支睾吸虫的感染者有 120 万人^[13] ,为此淡水鱼中的华支睾吸虫囊蚴对食品安全和人们健康构成了不容忽视的威胁 ,早发现、



表 4 符合性试验结果
Table 4 Results of the conformance test 份

项目	传统压片镜检法		合计
	阳性	阴性	
SYBR Green I 实时 阳性	9	2	11
荧光定量 PCR 方法 阴性	0	39	39
合计	9	41	50

早诊断是有效防治华支睾吸虫病传播的重要措施之一。

目前,在精准防疫和个性化治疗需求的推动下,以荧光定量 PCR 为代表的分子诊断技术凭借检测时间短、敏感性高、特异性强等优势,在畜牧兽医和人类医学等各个领域发挥了很大作用,尤其在抗新冠疫情的大环境中脱颖而出,被广泛用于疫病筛查、遗传性疾病、肿瘤伴随诊断等领域,但用该方法检测华支睾吸虫囊蚴的相关研究报道较少。E. J. Won 等^[14]针对韩国肠炎患者人群粪便样本建立了检测 8 种寄生虫的多重荧光定量 PCR 方法,并利用华支睾吸虫 CSCO I 基因序列设计引物,结果该方法的敏感性高于传统压片镜检法,但高浓度的红细胞或白细胞会对检测结果产生干扰。Cai X. Q. 等^[15]在 2012 年利用华支睾吸虫 ITS1 基因序列设计引物,建立了一种荧光定量 PCR 方法,结果该方法可定量检测出人粪便中华支睾吸虫的感染情况,且与肝片吸虫、日本血吸虫及曼氏血吸虫等均无交叉反应。乔铁等^[16]在 2012 年以华支睾吸虫 CSCO I 基因为靶基因建立了荧光定量 PCR 方法,并用该方法检测胆囊炎病人胆汁和胆囊结石中是否存在华支睾吸虫成虫或虫卵,结果该方法特异有效。近几年,一些研究人员针对华支睾吸虫囊蚴建立了胶体金、PCR 和 LAMP 等检测方法^[17-19],但存在检测成本较高或敏感性较低等缺点。CSCO I 基因序列为线粒体 DNA (mtDNA) 编码区的保守序列,且线粒体 DNA 的高度多态性导致了个体间的高度差异,适用于群体遗传学如生物进化、种族迁移、亲缘关系的鉴定及物种检测。因此,本试验利用华支睾吸虫 CSCO I 基因序列设计特异性引物建立了华支睾吸虫囊蚴 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法。SYBR Green I 是一种能结合到双链 DNA 小沟部位并发出荧光的染料,在 PCR 扩增过程中任何非特异性扩增都会影响结果的准确性。而本试验所建立的华支睾吸虫 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法呈现出良好的 S 型扩增曲线,仅出现特异性扩增产物的单峰,表明无引物二聚体或非特异性扩增产物出现;以标准阳性质粒为模板建立的标准曲线的斜率为-3.21, R^2 为 0.982 3;该方法具有良好的特异性,与阔节裂头绦虫、日本血吸虫、棘口吸虫、柔嫩艾美耳球虫无交叉反应,保证了结果的准确性;最低

检出限为 1×10^2 copies/ μ L,为微量样品级别,批内和批间变异系数均小于 5%,说明该方法具有良好的敏感性和稳定性。

综上所述,本试验成功建立的华支睾吸虫囊蚴 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法为后续开展华支睾吸虫囊蚴的诊断、流行病学检测及制订有效预防华支睾吸虫病的相关措施等研究提供了技术支持。

参考文献:

- [1] 黄继磊,王耀,周霞.我国常见食源性寄生虫病流行现状与防治进展[J].中国血吸虫病防治杂志,2021,33(4):424-429.
- [2] WANG D, KORHONEN P K, GASSER R B, et al. Improved genomic resources and new bioinformatic workflow for the carcinogenic parasite *Clonorchis sinensis*: biotechnological implications[J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(4): 894-904.
- [3] NA B K, PAK J H, HONG S J. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis [J]. Acta Trop, 2020, 203: 105309.
- [4] 孙青松,于妮娜,尚信池,等.华支睾吸虫病在我国的流行及诊断方法研究进展[J].动物医学进展,2019,40(8):84-88.
- [5] 钱门宝,李石柱,周晓农.我国重要食源性寄生虫病的流行和控制[J].热带病与寄生虫学,2021,19(5):241-244.
- [6] 何婷,程娜,周岩,等.华支睾吸虫遗传多样性的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2020,15(12):1483-1487.
- [7] 戴思敏,余晴,马晓疆,等.中国大陆淡水鱼华支睾吸虫感染率的 meta 分析[J].中国血吸虫病防治杂志,2022,34(1):16-27.
- [8] QIAN M B, UTZINGER J, KEISER J, et al. Clonorchiasis [J]. Lancet, 2016, 387(10020): 800-810.
- [9] QIAN M B, ZHOU C H, ZHU H H, et al. From awareness to action: NIPD's engagement in the control of food-borne clonorchiasis [J]. Adv Parasitol, 2020, 110: 245-267.
- [10] REDDY A K, CHAKRABARTY M, LIU Y, et al. Case report: *Clonorchis sinensis* infection associated with eosinophilic pneumonia [J]. Am J Trop Med Hyg, 2021, 104(6): 2065-2068.
- [11] QIAN M B, LI H M, JIANG Z H, et al. Severe hepatobiliary morbidity is associated with *Clonorchis sinensis* infection: the evidence from a cross-sectional community study [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(1): e0009116.
- [12] LEE D H, KIM A R, LEE S H, et al. Virus-like particles vaccine containing *Clonorchis sinensis* tegumental protein induces partial protection against *Clonorchis sinensis* infection [J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1): 626.
- [13] SAIJUNTHA W, SITHITHAWORN P, PETNEY T N, et al. Foodborne zoonotic parasites of the family opisthorchiidae [J]. Res Vet Sci, 2021, 135: 404-411.
- [14] WON E J, KIM S H, KEE S J, et al. Multiplex real-time PCR assay targeting eight parasites customized to the Korean population: potential use for detection in diarrheal stool samples from gastroenteritis patients [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166957.
- [15] CAI X Q, YU H Q, BAI J S, et al. Development of a TaqMan based real-time PCR assay for detection of *Clonorchis sinensis* DNA in human stool samples and fishes [J]. Parasitology International, 2012, 61(1): 183-186.
- [16] 乔铁,郑培明,马瑞红,等.实时荧光定量 PCR 检测胆囊结石中华支睾吸虫 DNA 的研究[J].中国病原生物学杂志,2012,7(10):767-769.
- [17] 孙恒昌,周心怡,林志鹏,等.淡水鱼华支睾吸虫囊蚴感染的胶体



金免疫检测技术建立[J].热带医学杂志 2022 22(6) : 774-778.
[18] 高俊峰,王鑫,毛瑞峰,等.淡水鱼中 3 种吸虫囊蚴多重 PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报 2022 44(2) : 157-161.

[19] 朱海,汪奇志,孙成松,等.淡水鱼华支睾吸虫囊蚴 LAMP 检测方法的建立[J].热带病与寄生虫学 2021 19(4) : 181-184.

Establishment of SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method for *Clonorchis sinensis* metacercariae

YUAN Shuxian¹, HOU Xusen¹, GONG Pengtao², GUO Yanbing¹, DONG Hang¹, SUN Xingzhong¹,
WANG Nan¹, CAO Lili^{1*}

(1. Jilin Academy of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Changchun 130062, China;

2. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: To establish a specific and sensitive SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method for metacercariae of *Clonorchis sinensis*, the specific primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I of *Clonorchis sinensis* were designed; the standard curve was drawn; the amplification system and procedure were optimized, and the SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR method was established, and its sensitivity, specificity, repeatability and compliance were evaluated. The results showed that the optimal concentration of primers was 750 nmol/L and the optimal annealing temperature was 57 °C. The slope of the standard curve was -3.21; the intercept was 35.23, and the correlation coefficient R^2 was 0.9823. The minimum detection limit of this method was 1×10^2 copies/ μ L. The inter- and intra-batch coefficients of variation were 1.53%-2.59% and 0.36%-0.76%, respectively, showing good repeatability. Only the standard positive plasmids *C. sinensis* metacercariae and *Fasciola hepatica* showed specific amplification curves, with good specificity. The coincidence rate was 96% compared with the traditional compression microscopy method. It indicated that the SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR method was sensitive, specific and stable, which provided technical support for the subsequent epidemiological investigation of *C. sinensis* metacercariae infection in freshwater fish.

Keywords: *Clonorchis sinensis*; metacercariae; CSCO I; SYBR Green I; real-time fluorescent quantitative PCR

(011)

(上接第 6 页)

[17] PANG M, LI C, ZHENG D, et al. S1PR2 knockdown promotes migration and invasion in multiple myeloma cells via NF- κ B activation[J]. Cancer Manag Res 2020 12: 7857-7865.
[18] CHENG D D, LI J, LI S J, et al. CNOT1 cooperates with LMNA to aggravate osteosarcoma tumorigenesis through the Hedgehog signaling pathway[J]. Mol Oncol 2017, 11(4) : 388-404.
[19] BO C, LI X, HE L, et al. A novel long noncoding RNA HHIP-AS1 suppresses hepatocellular carcinoma progression through stabilizing

HHIP mRNA[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 520(2) : 333-340.

[20] ZHANG T, HU J, WANG X, et al. MicroRNA-378 promotes hepatic inflammation and fibrosis via modulation of the NF- κ B-TNF α pathway[J]. Hepatol 2019 70(1) : 87-96.
[21] YANG J J, TAO H, LI J. Hedgehog signaling pathway as key player in liver fibrosis: new insights and perspectives[J]. Expert Opin Ther Targets, 2014 18(9) : 1011-1021.

Prediction and bioinformatic analysis of host target genes regulated by miRNAs in the extracellular membrane vesicles of *Clonorchis sinensis*

WEI Wei¹, SUN Yunyi¹, MAO Ruifeng¹, ZHANG Aihui¹, JIA Bin², ZHANG Jun²,
WANG Chunren¹, GAO Junfeng^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161006, China)

Abstract: In order to evaluate the risk of parasite-derived miRNAs in extracellular membrane vesicles of *Clonorchis sinensis* in cross-species regulation of host genes, the miRBase database was used to screen the mature sequences of parasite-derived miRNAs shared by *Clonorchis sinensis* (*C. sinensis*) extracellular vesicles and the infected host cells. miRanda software was used to predict the target genes of the top 10 miRNAs in extracellular membrane vesicles, and the top 10 target genes of each miRNAs score were selected as candidate target genes. NCBI and Bing search tools were used to search the functions of the candidate target genes of miRNAs, and GO functional annotation and KEGG enrichment analysis were used for bioinformatics analysis of target genes. The results showed that 10 miRNAs in the extracellular vesicles of *C. sinensis* corresponded to a total of 8128 host-related target genes. Twelve candidate target genes had no relevant functional reports; twelve candidate target genes were related to liver function, and the remaining candidate target genes played important roles in cancer, signal transduction, structural skeleton, proliferation and differentiation, and migration. The candidate target genes Taf10 and Onecut2 were related to the development of liver and hepatobiliary duct. Gng1 and Hhip were involved in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Hedgehog signaling pathways associated with fibrosis, respectively. These results indicated that insect-derived miRNAs had the potential to target host cells and participate in the development of host liver fibrosis and liver cancer.

Keywords: *Clonorchis sinensis*; miRNAs; extracellular membrane vesicles; target genes; bioinformatics

(011)

• 试验研究 •

华支睾吸虫细胞外囊泡中 miRNAs 调控宿主靶基因的预测及生物信息学分析

(作者魏伟等 正文见 1-6, 12 页)

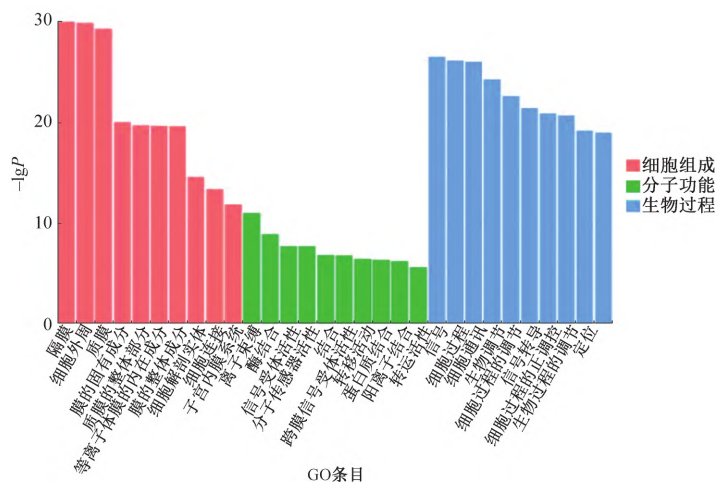


图1 GO 功能注释分析结果

Fig.1 GO function annotation analysis results

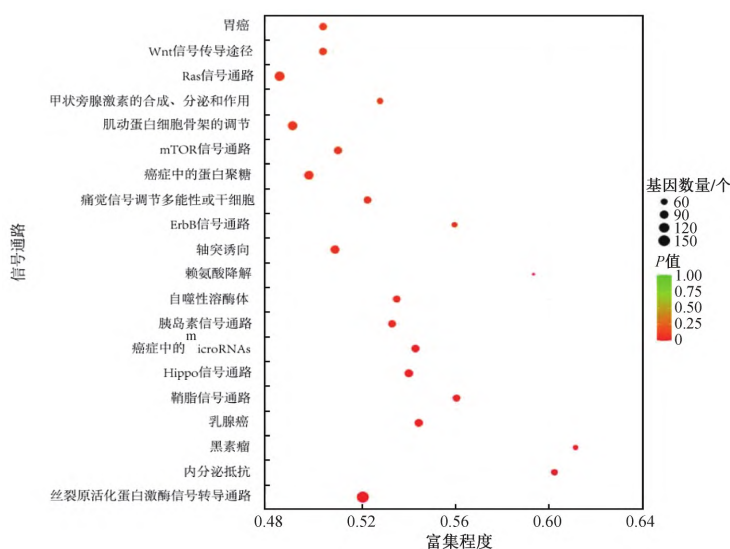
注: P 值一般取值范围为 0~1, 越接近 0, 富集越显著。

图2 KEGG 富集分析结果

Fig.2 Results of KEGG enrichment analysis

• 试验研究 •

华支睾吸虫囊蚴 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立

(作者苑淑贤等 正文见 7-12 页)

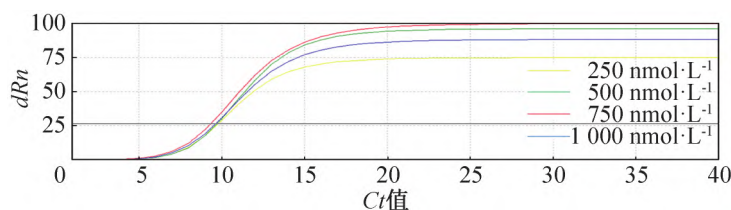


图2 不同引物浓度的扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of different primer concentrations

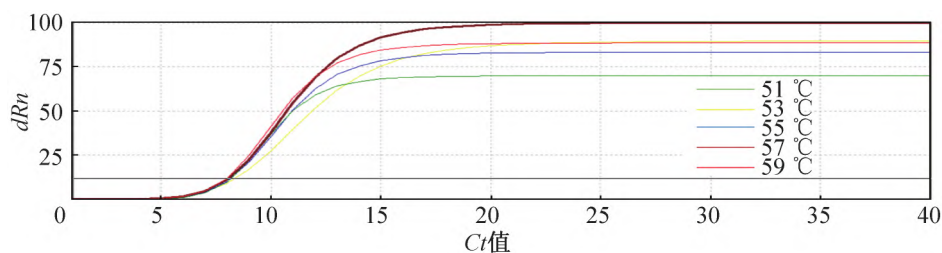


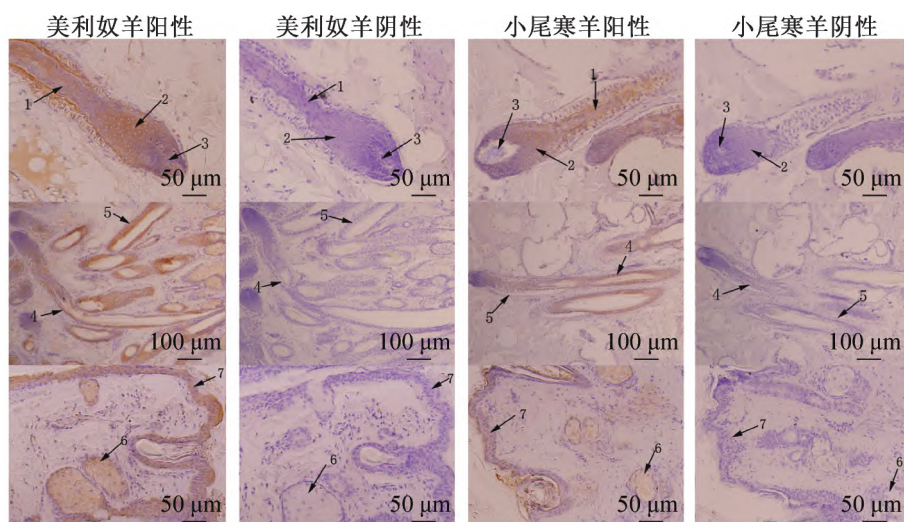
图 3 不同退火温度的扩增曲线

Fig.3 Amplification curve of different annealing temperatures

• 畜牧科学 •

Krox20 调控 IGFBP5 表达影响羊毛弯曲的研究

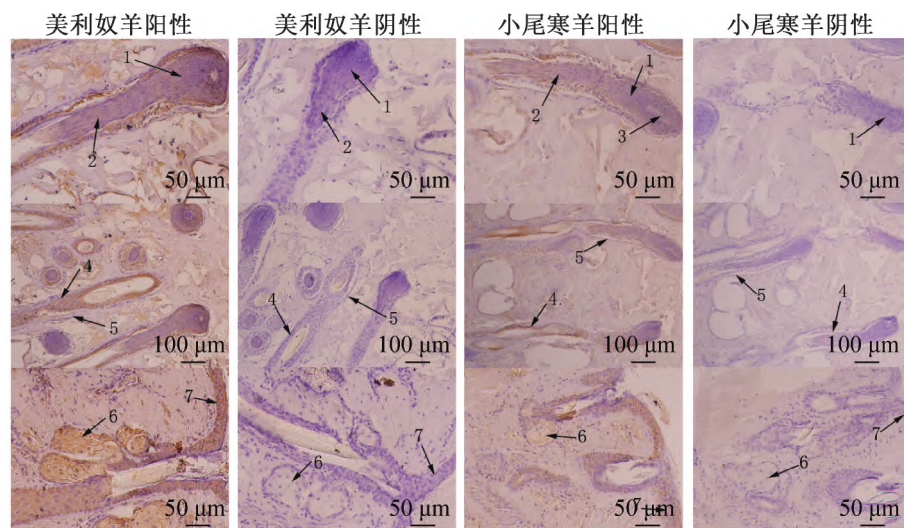
(作者吴晋强等 正文见 65-71 页)



1. 毛干; 2. 毛基质; 3. 毛乳头; 4. 内根鞘; 5. 外根鞘; 6. 皮脂腺; 7. 表皮。

图 1 Krox20 蛋白在美利奴羊和小尾寒羊体侧皮肤中的表达情况

Fig.1 Expression of Krox20 protein in the body side skin of Merino sheep and small-tailed Han sheep



1. 毛基质; 2. 毛干; 3. 毛乳头; 4. 内根鞘; 5. 外根鞘; 6. 皮脂腺; 7. 表皮。

图 3 IGFBP5 蛋白在美利奴羊和小尾寒羊体侧皮肤中的表达情况

Fig.3 Expression of IGFBP5 protein in the body side skin of Merino sheep and small-tailed Han sheep